総 説

抗 β_2 -グリコプロテイン I 抗体の抗リン脂質抗体症候群における病原性

保 田 晋 助

Pathogenic roles of anti- β_2 -GPI antibody in patients with antiphospholipid syndrome

Shinsuke YASUDA

Department of Medicine II, Hokkaido University Graduate School of Medicine

(Received November 2, 2004)

summary

Antiphospholipid syndrome (APS) is characterized by arterial and/or venous thrombosis and pregnancy morbidity in the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) and prothrombin are representative autoantigens, the former more extensively investigated. Anti- β_2 -GPI antibodies are not only markers of APS, but also are considered to be pathogenic. Possible roles of anti- β_2 -GPI antibodies are, 1) enhancement the binding of β_2 -GPI to anionic phospholipid and inhibition of protein C activation/activated protein C, 2) to form anti- β_2 -GPI antibody- β_2 -GPI-oxidized LDL complex and to promote uptake by sub-endothelial macrophage, resulting in atherosclerosis, 3) to dimerize β_2 -GPI on the surface of platelets and to activate platelets via apoE receptor 2 and subsequent signal transduction, 4) stimulation of monocytes via p38 MAP kinase pathway and induction of tissue factor production. In pregnancy morbidity, activation of complement cascade plays an important role. These findings may provide a novel target in the management of APS.

Key words——thrombosis, atherosclerosis, protein C, p38 MAPK, complement cascade

抄 録

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome ; APS) は、抗リン脂質抗体 (Antiphospholipid antibodies ; aPL) が検出され、動静脈血栓症または妊娠合併症を生ずる疾患である。aPL の対応抗原として、 β_2 -グリコプロテイン I (β_2 -GPI) やプロトロンビンが挙げられ、特に抗 β_2 -GPI 抗体は病原性を有する自己抗体として研究されてきた。抗 β_2 -GPI 抗体が血栓症を引き起こす機序としては、1) 自己抗体の存在により β_2 -GPI の陰性荷電リン脂質への結合性が高まり、 β_2 -GPI のもつプロテイン C に対する抑制作用が強調されること、2) β_2 -GPI-LDL 複合体の内皮下マクロファージによる取り込みを促進し、動脈硬化を進展させること、3) 血小板の Apo-E レセプターへの結合を介して血小板の粘着能を上昇させること 4) 内皮細胞や単球表面に結合し、p38 MAP キナーゼの系を介して組織因子を発現、局所を過凝固に導くことなどが報告されている。また、習慣流産の機序としては、胎盤梗塞のみならず補体系の活性化が報告された。これらの病態の解明が、新しい治療に繋がることが期待される。

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome ; APS) は、抗リン脂質抗体 (Antiphospholipid antibodies ; aPL) が検出され、動静脈血栓症または妊娠合併症を生ずる疾患である。原発性と、全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患に続発する二次性とに分類され、内科、産科、脳外科領域の診療において重要な二次性血栓症の原因疾患である。aPL は実際にはリン脂質を直接認識しているわけではなく、リン脂質上のリン脂質結合

蛋白を認識していることが明らかとなった^{1,2)}。このようなコファクターの代表的なものとして、後述する β_2 -グリコプロテイン I (β_2 -GPI) やプロトロンビンが挙げられるが、他にもプロテイン C、プロテイン S、第 VII, XII 因子、アネキシン V、高分子、低分子キニノゲンや von Willebrand 因子なども報告されている。特に抗 β_2 -GPI 抗体は、動物実験の結果からも疾患マーカーとしてのみならず、実際に血栓症を引き起こす抗体であると考えられている³⁾。ここでは、最近の知見も交えながら抗 β_2 -GPI 抗体がどのように APS の病態に影響を与えるかについて概説したい。

1. APS 患者における凝固・線溶系の異常

APS 患者における凝固線溶系の異常に関して、これまでに多くの検討が行われてきた。APS 患者では線溶系の活性低下がみられ、これは主に血管内皮細胞の PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 産生亢進によるものであるとの報告がなされており、これに tPA (tissue-plasminogen activator) の産生低下を伴うとする説もある^{4,5)}。リポ蛋白 (a) [Lp(a)] はプラスミノゲンと競合することなどから線溶系を抑制する作用を持つが、APS 患者では血中 Lp(a) 濃度の上昇を認めることが報告されている⁶⁾。こうした凝固・線溶バランスの異常が APS 患者にみられる血栓傾向を反映していると考えられるが、その機序についてはまだ不明の点も多い。

2. β_2 -GPI の構造と生理活性

β_2 -GPI は 5 つのシンドメインとよばれる繰り返し構造からなり、血漿中に 200 $\mu\text{g/ml}$ と比較的高濃度に存在する糖蛋白である。ドメイン I-IV は非常にホモロジーが高いが、ドメイン V は陽性荷電をもつリジンクラスターを有し、さらに C 末端に疎水性で可動性を持つループ構造を有する。 β_2 -GPI は陰性荷電リン脂質に結合することが知られているが、この結合はリジンの持つ陽性荷電の働きに加え、疎水性のループがリン脂質膜に入り込むことによることが示唆された⁷⁾。リン脂質膜の他にもヘパリン、DNA、酸化 LDL、apoptotic body など他の陰性荷電物質にも結合し、様々な生理活性を持つ。陰性荷電表面は内因系の凝固作用を引き起こすことから β_2 -GPI は抗凝固作用を持つと考えられてきた。実際に、陰性荷電リン脂質上においてプロトロンビナーゼ複合体やテンナーゼ複合体の活性を抑制し、また、第 XII 因子の活性化を阻害することが報告された。 β_2 -GPI が ADP による血小板凝集能を抑制することも知られている。最近では、直接第 XI 因子に結合することによりその活性化を抑制することも報告された⁸⁾。一方で、 β_2 -GPI は凝固促進作用も併せ持つことが知られるようになってきた。陰性リン脂質膜上で蛋白 C 活性を抑制することが報告され、また、 β_2 -GPI ノックアウトマウスの解析結果からはトロンビン生成に関与することも示唆された。 β_2 -GPI はその 30% がリポ蛋白分画に存在するが、脂質系に対する作用としては、リポ蛋白リパーゼを活性化する作用を持ち、

血中トリグリセリド濃度を低下させることも報告されている。 β_2 -GPI は酸化 LDL に結合することによって、内皮下のマクロファージによる食食を抑制し、抗動脈硬化作用を発揮すると考えられている⁹⁾。しかし、 β_2 -GPI 欠損家系においては非刺激時には凝固系マーカーに異常はなく、明らかな血栓の既往もなかったことや、脂質異常にも一定の傾向がなかったことから、少なくとも通常の状態では凝固線溶系や脂質代謝にとって必須の分子とは考えにくい^{10,11)}。

3. 自己抗原としての β_2 -GPI

β_2 -GPI の陰性荷電リン脂質への結合はそれほど強いものではないが、ある種の抗 β_2 -GPI 抗体が結合するとリン脂質への結合が 100 倍も強固なものになることが知られている。 β_2 -GPI 抗体の認識するエピトープは β_2 -GPI がリン脂質に結合して立体構造が変化することによって初めて表出するか¹²⁾、陰性荷電リン脂質上で β_2 -GPI の濃度が上昇することによって、抗原性を増すと考えられている。 β_2 -GPI ドメイン欠損ミュータントを用いた検討では、患者由来の aPL や患者血清はドメイン I を認識するとの報告と¹³⁾、ドメイン IV を認識するとの報告がある。ドメイン V など、他のドメインに結合するとの報告もあり、自己抗体の多様性を反映していると考えられる。ペプチドライブラリーを用いた我々の検討では、ドメイン IV に存在する Trp²³⁵ を中心に B cell エピトープが存在することが示唆され、アミノ酸置換によって抗 β_2 -GPI 抗体の結合性が低下した¹⁴⁾。

β_2 -GPI の抗原性に与える影響として、 β_2 -GPI の限定分解があげられる。 β_2 -GPI は、線溶系が活性化された状態においてプラスミンまたは第 X 因子によってドメイン V の疎水性ループが限定分解を受け、リン脂質結合能を失う (nicked β_2 -GPI)。この限定分解により、抗 β_2 -GPI 抗体に対する β_2 -GPI の抗原性が損なわれることが示された。また、 β_2 -GPI の遺伝子多型 (SNPs) のうち、Trp/Ser³¹⁶ 変異においては、Ser³¹⁶ アレルをもつ β_2 -GPI はリン脂質結合能を持たないため、抗リン脂質抗体症候群の発症に関して protective に働くと考えられる。Val/Leu²⁴⁷ 変異においては、Val²⁴⁷ アレルが抗リン脂質抗体症候群においてリスクファクターとなることが複数のグループによる疫学的検討において示された。実際に Val²⁴⁷ あるいは Leu²⁴⁷ を有するリコ

図 1

ンビナント β_2 -GPI を用いて患者由来のモノクローナル抗 β_2 -GPI 抗体および患者由来 IgG の結合を検討したところ、Val²⁴⁷ を有する β_2 -GPI がより高い抗原性を示した。コンピュータを用いた蛋白モデリングでは、この塩基置換により、ドメイン IV-V 間の相互作用に変化を来とし、 β_2 -GPI の立体構造に影響をあたえることが予想された (図 1)¹⁵⁾。ただし、真に病原性をもつ抗体がどのエピトープを認識するかについては今後の検討を要する。

T cell エピトープについては、 β_2 -GPI 由来ペプチドに対する患者 T cell の反応性が解析されている^{16,17)}。これらの研究から、APS 患者由来の T cell はアミノ酸 244-264, 276-290 など、ドメイン V 由来のペプチドを有為に認識することが示された。

4. 抗 β_2 -GPI 抗体が血栓症を引き起こす機序 (表)

a) 凝固・線溶系に対する作用

β_2 -GPI 自体のリン脂質上における凝固線溶系への作用はそれほど強いものではないと推察されるが、抗 β_2 -GPI 抗体結合によって β_2 -GPI のリン脂質への結合性が著しく増すことが、 β_2 -GPI の機能に影響を与える可能性が考えられている。これまでの報告では、抗 β_2 -GPI 抗体によって活性化血小板における β_2 -GPI の活性化第 X 因子産生を抑制する作用が損なわれること、抗 β_2 -GPI 抗体が β_2 -GPI 存在下において活性化プロテイン C およびプロテイン C の活性化をさらに強く抑制することが知られている¹⁸⁾。

b) 動脈硬化促進作用

β_2 -GPI 自体は前述のように、酸化 LDL への結合を介して抗動脈硬化作用を発揮するが、酸化

表 抗 β_2 -GPI 抗体の作用

a) 凝固線溶系
プロテイン C 活性化の抑制
FXa 産生の抑制
b) 動脈硬化
内皮下マクロファージによる酸化 LDL の取り込み促進
c) 血小板の活性化
Apo-ER2 を介したトロンボキサンの産生亢進
d) 内皮細胞・単球の活性化
p38MAP キナーゼの活性化を介した tissue factor の産生亢進
e) 補体経路の活性化による胎児障害 (抗 β_2 -GPI 抗体の関与は不明)

LDL- β_2 -GPI の複合体に抗 β_2 -GPI 抗体が結合すると、マクロファージは Fc γ レセプターを介してこれを積極的に取り込み、泡沫化が促進する¹⁹⁾。つまり自己抗体の存在によって β_2 -GPI の生理活性が全く逆の作用に変えられることが示唆される。最近、この酸化 LDL- β_2 -GPI の複合体に対する aPL の測定系が開発され、特に動脈血栓と高い相関を持つことが示された²⁰⁾。この事実も、aPL が動脈硬化を促進するという説を裏付けるものと考えられる。

c) 血小板の活性化

β_2 -GPI の細胞膜への結合には、抗 β_2 -GPI 抗体を介した β_2 -GPI の 2 量体形成が重要であるとの報告があるが、これに基づき、人工的にダイマーとしたりコンビナント β_2 -GPI を用いた血小板機能に関する研究がなされた。二量体 β_2 -GPI は、アポリポプロテイン E レセプター 2 (Apo-ER2) を介して血小板に結合し、下流にシグナルが伝達されて最終的にトロンボキサン合成を亢進促進する。その結果、血小板のコラーゲン粘着能が亢進することが報告された²¹⁾。

d) 内皮細胞・マクロファージの活性化

陰性荷電リン脂質を表出させた血管内皮細胞表面や単核球に β_2 -GPI が結合し、抗 β_2 -GPI 抗体はこれを介して血管内皮細胞を活性化することが分かってきた^{22,23)}。具体的には、E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 などの接着因子の発現、PAI-1, エンドテリン 1 や tissue factor の産生亢進によって局所を血栓傾向に導く可能性が示唆されているが、これらは toll-like receptor, MyD88, NF- κ B の経路を介することが示された²⁴⁾。最近我々は、患者由来のモノ

図 2

クローナル抗 β_2 -GPI 抗体を用いて患者末梢血単核球を刺激し、cDNA アレイの方法で遺伝子発現をスクリーニングした結果、MAP キナーゼ経路に關与するシグナル分子の発現上昇を認めた。さらに、単球系細胞株を用いた系において、抗 β_2 -GPI 抗体が β_2 -GPI 依存性に tissue factor を発現することを確認した。また、この活性化は p38 MAP キナーゼ経路を介したものであり、その阻害剤である SB203580 の添加によって tissue factor の産生が低下することを示した²⁵⁾。このことは、抗炎症作用をもつ p38 MAP キナーゼ阻害剤による、APS の治療の可能性を示唆するという点で興味深いと思われる。(図 2)

e) 補体を介した作用

APS における習慣流産に関して、従来の胎盤梗塞が原因であるとする説に対して、補体経路の活性化が重要であるとする報告がなされた。妊娠マウスに APS 患者由来の IgG またはその F(ab)'2 部分を投与したところ、ほぼ 4 倍の確立で胎児死亡を認め、C5 および好中球が胎児障害の中心的役割を果たしていることが分かった。一方、C4 欠損マウスでは胎児死亡は低率であった²⁶⁾。この研究はモノクローナル抗 β_2 -GPI 抗体を使った系ではないため、純粋に自己抗体の作用とは言い切れない面もあるが、重要な知見と考えられる。ごく最近、同グループからヘパリンの有効性はその抗凝固作用によるものではなく、補体の活性化を抑制するためであるとの報告がなされた²⁷⁾。

ま と め

APS における抗 β_2 -GPI 抗体の重要性については

異論を待たないが、その病原性および作用機序となると、まだまだ不明な点も多い。これまでは、リン脂質膜上での凝固因子を介した作用が主に注目されてきたが、各種細胞表面に結合することによってシグナル伝達が起こること、酸化 LDL- β_2 -GPI-抗 β_2 -GPI 抗体が内皮下マクロファージによって積極的に貪食されること、抗 β_2 -GPI 抗体の関与は不明だが補体の関与などが示され、よりダイナミックで複雑な作用機序を有することが分かってきた。つまり、さらなる病態の解明によって現在行われている抗凝固療法以外の治療の開発に繋がってくる可能性があるものと期待される。

文 献

- 1) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA.: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(11): 4120-4124, 1990.
- 2) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T.: Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* **336**(8708): 177-8, 1990.
- 3) Pierangeli SS, Liu SW, Anderson G, Barker JH, Harris EN.: Thrombogenic properties of murine anti-cardiolipin antibodies induced by β_2 -glycoprotein 1 and human immunoglobulin G antiphospholipid antibodies. *Circulation* **94**(7): 1746-1751, 1996.
- 4) Jurado M, Paramo JA, Gutierrez-Pimentel M, Rocha E.: Fibrinolytic potential and anti-phospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disorders. *Thromb Haemost* **68**(5): 516-520, 1992.
- 5) Ames PR, Tommasino C, Iannaccone L, Brilante M, Cimino R, Brancaccio V.: Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies- a crucial role for acquired free protein S deficiency. *Thromb Haemost* **76**(2): 190-194, 1996.
- 6) Atsumi T, Khamashta MA, Andujar C, Leandro MJ, Amengual O, Ames PR et al.: Elevated plasma lipoprotein(a) level and its association with impaired fibrinolysis in patients with antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* **25**(1): 69-73, 1998.

- 7) Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ et al. : Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J* **18**(19) : 5166–5174, 1999.
- 8) Shi T, Iverson GM, Qi JC, Cockerill KA, Linnik MD, Konecny P et al. : β_2 -Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa : loss of inhibition by clipped beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(11) : 3939–3944, 2004.
- 9) Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. : Involvement of β_2 -glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* **107**(3) : 569–573, 1997.
- 10) Yasuda S, Tsutsumi A, Chiba H, Yanai H, Miyoshi Y, Takeuchi R et al. : β_2 -glycoprotein I deficiency : prevalence, genetic background and effects on plasma lipoprotein metabolism and hemostasis. *Atherosclerosis* **152**(2) : 337–346, 2000.
- 11) Takeuchi R, Atsumi T, Ieko M, Takeya H, Yasuda S, Ichikawa K et al. : Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with β_2 -glycoprotein I deficiency. *Blood* **96**(4) : 1594–1595, 2000.
- 12) Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. : Anticardiolipin antibodies recognize β_2 -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* **179**(2) : 457–62, 1994.
- 13) Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. Anti- β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of β_2 -GPI. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(26) : 15542–15546, 1998.
- 14) Koike T, Ichikawa K, Atsumi T, Kasahara H, Matsuura E. : β_2 -glycoprotein I-anti- β_2 -glycoprotein I interaction. *J Autoimmun* **15**(2) : 97–100, 2000.
- 15) Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K et al. : Significance of Valine/leucine247 Polymorphism of β_2 -glycoprotein I in Antiphospholipid Syndrome : Increased Reactivity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies to the Valine247 β_2 -glycoprotein I Variant. *Arthritis Rheum* (in press).
- 16) Kuwana M. : Autoreactive CD4(+) T cells to β_2 -glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* **2**(4) : 192–198, 2003.
- 17) Mauduit G, Souteyrand P, Thivolet J. : [Antiprothrombinase type of circulating anticoagulants during acute disseminated lupus erythematosus]. *Ann Dermatol Venereol* **109**(6–7) : 557–564, 1982.
- 18) Ieko M, Ichikawa K, Triplett DA, Matsuura E, Atsumi T, Sawada K et al. : β_2 -glycoprotein I is necessary to inhibit protein C activity by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Arthritis Rheum* **42**(1) : 167–174, 1999.
- 19) Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. : Involvement of β_2 -glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* **107**(3) : 569–573, 1997.
- 20) Lopez D, Garcia-Valladares I, Palafox-Sanchez CA, De LT, I, Kobayashi K, Matsuura E et al. : Oxidized low-density lipoprotein / β_2 -glycoprotein I complexes and autoantibodies to oxLig-1/ β_2 -glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* **121**(3) : 426–436, 2004.
- 21) Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. : Dimers of β_2 -glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem* **278**(36) : 33831–33838, 2003.
- 22) Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. : The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* **79**(2) : 276–281, 1998.
- 23) Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G, Molteni R et al. : Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti- β_2 -glycoprotein I) antibodies : effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum* **44**(12) : 2870–2878, 2001.
- 24) Raschi E, Testoni C, Bosisio D, Borghi MO, Koike T, Mantovani A et al. : Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood* **101**(9) : 3495–3500, 2003.

- 25) Bohgaki M, Atsumi T, Yamashita Y, Yasuda S, Sakai Y, Furusaki A et al. : The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β_2 Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* **16**(11) : 1633–1641, 2004.
- 26) Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM et al. : Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrom. *J Clin Invest* **112**(11) : 1644–1654, 2004.
- 27) Girardi G, Redecha P, Salmon JE. : Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med*. **10**(11) : 1222–1226, 2004.